



Nationales Forschungsprogramm NFP 53
«Muskuloskeletale Gesundheit –
chronische Schmerzen»

Maligne Hyperthermie: Gentests statt Muskelbiopsien¹

Soledad Levano, Albert Urwyler, Susan Treves, Mirko Vukcevic, Thierry Girard

Departement für Anästhesie und Biomedizin, Universitätsspital Basel

Hintergrund

Die sogenannte maligne Hyperthermie (MH) ist eines der wichtigsten pharmakogenetischen Krankheitsbilder in der Anästhesie. Bei Personen, die anfällig sind auf diese Störung, kann nach Verabreichung eines depolarisierenden Muskelrelaxans (Succinylcholin) und/oder nach inhalativen Anästhetika wie Halothan, Isofluran, Sevofluran oder Desfluran eine äusserst schwere hypermetabole Situation entstehen. Dies bedeutet, dass ihr Stoffwechsel entgleist, und es in den Zellen der Skelettmuskulatur zu einer unkontrollierten Freisetzung von Kalzium kommt. Spätes Symptom dieser Erkrankung ist ein rapider Temperaturanstieg. Eine solche Episode kann tödlich verlaufen, wenn sie nicht rasch erkannt und entsprechend behandelt wird. Maligne Hyperthermie manifestiert sich klinisch sehr unterschiedlich, deshalb ist die Häufigkeit ihres Auftretens schwierig abzuschätzen. Man geht von einer Prävalenz von etwa 1 auf 10 000 bis 30 000 Anästhesien aus. Die Anfälligkeit auf maligne Hyperthermie wird vererbt und zwar nach dem autosomal dominanten Erbgang. Als Ursache konnten Mutationen im Gen des Ryanodinrezeptors in der Skelettmuskulatur (RYR1) identifiziert werden. Diese sind bei rund der Hälfte aller betroffenen Familien für die entsprechende Veranlagung verantwortlich. Bei den übrigen Familien ist die molekulare Grundlage der Anfälligkeit auf die Krankheit bisher unklar. Mutationen im RYR1-Gen lösen auch die Central Core Disease (CCD) aus – eine angeborene Myopathie, die charakterisiert ist durch eine proximal betonte, nur schwach fortschreitende Muskelschwäche. Patienten, die unter der Central Core Disease leiden, sind meist auch anfällig auf maligne Hyperthermie.

Zielsetzung

Maligne Hyperthermie ist eine subklinische Myopathie. Eine entsprechende Anfälligkeit kann erst diagnostiziert werden, wenn die Betroffenen in Kontakt mit auslösenden Substanzen, sogenann-

ten Triggern, gekommen sind. Aus diesem Grund braucht es Methoden, um eine präsymptomatische Diagnostik vornehmen zu können. Das ist vor allem deshalb wichtig, weil für Patienten mit einer Anfälligkeit auf maligne Hyperthermie inzwischen alternative – und sichere – Anästhesieverfahren zur Verfügung stehen.

Der «In-vitro-Kontrakturtest» gilt bis heute als Goldstandard, um zu untersuchen, ob Menschen auf maligne Hyperthermie anfällig sind. Dazu braucht es kleine Muskelbündel, die mittels einer offenen Muskelbiopsie gewonnen werden. Sie werden Halothan bzw. Koffein ausgesetzt – unter supramaximaler Stimulation. Eine Muskelkontraktur von 2 Millinewton (mN) oder mehr gilt als positives Testresultat. Das einzige von der *European Malignant Hyperthermia Group* (EMHG) akkreditierte Schweizer Testzentrum wird am Departement Anästhesie des Universitätsspitals Basel betrieben.

Seit 2001 gibt es Vorschriften der EMHG für die molekulargenetische Diagnose einer Anfälligkeit auf maligne Hyperthermie [1]. Als diagnostische Marker sind lediglich diejenigen Mutationen anerkannt, die erwiesenermassen einen funktionellen Effekt haben. Eine molekulargenetische Untersuchung ist für die Patienten körperlich weniger belastend als eine offene Muskelbiopsie. Fällt der Gentest negativ aus, kann aber eine Anfälligkeit auf maligne Hyperthermie nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden. Weil die genetischen Ursachen der malignen Hyperthermie vielfältig sind, muss in diesem Fall zum Ausschluss bzw. zur Bestätigung einer Empfindlichkeit auf maligne Hyperthermie ein «In-vitro-Kontrakturtest» durchgeführt werden. Das Ziel der vorliegenden Studie war denn auch, zusätzliche Mutationen im RYR1-Gen zu identifizieren und sie – im Sinne einer Verfeinerung – für die genetische Diagnostik der malignen Hyperthermie nutzbar zu machen.

¹ Ryanodinrezeptor assoziierte Myopathien: Identifikation und Charakterisierung neuer Mutationen. Projektnummer: 405340-104853.

Methode und Resultate der genetischen Analyse

Im Rahmen unseres NFP53-Forschungsprojekts haben wir all jene Familien mit maligner Hyperthermie genauer untersucht, bei denen in früheren Studien keine der bisher bekannten RYR1-Mutationen identifiziert wurde [2]. Das RYR1-Gen ist sehr gross. Es hat 106 Exons und mehr als 150 000 Basenpaare, deshalb ist die genetische Analyse aufwendig. Wir haben ein Protokoll erarbeitet, welches erlaubt, die gesamte kodierende Sequenz des RYR1-Gens möglichst effizient zu bestimmen. Proben aus Muskelbiopsien lieferten das Material, um mRNA zu isolieren. Das bildete die Ausgangslage, um alle kodierenden Teile des RYR1-Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in 23 Schritten zu amplifizieren und schliesslich zu sequenzieren. Unter 36 Familien mit maligner Hyperthermie haben wir bei 23% – oder 64% – eine oder mehrere Mutationen gefunden: 17 bisher unbekannte und 5 seltene, die erst kürzlich von anderen Forschungsgruppen identifiziert worden waren (Tab. 1 [↔](#)). Um festzustellen, wie häufig bestimmte genetische Polymorphismen auftreten, haben wir 100 anonyme Kontrollproben auf die neuen Mutationen untersucht. Alle Proben haben sich als negativ erwiesen. In insgesamt acht Familien wurde eine

bekannte Mutation identifiziert, in vier Familien sogar gleichzeitig zwei verschiedene solcher Mutationen. Anders als ursprünglich vermutet, ist klar geworden, dass sich die RYR1-Mutationen nicht auf bestimmte Regionen des RYR1-Gens – auf sogenannte «hot-spots» – beschränken. In Familien, wo Mutationen gefunden wurden, haben wir weitere Familienmitglieder untersucht. Die Analyse von insgesamt 190 Personen aus 20 verschiedenen Familien hat ergeben, dass der «In-vitro-Kontrakturtest» und die Genotypisierung in 94% der Fälle zum gleichen Ergebnis kommen.

Methode und Resultate der funktionellen Analyse

In einem zweiten Teil unserer Studie wollten wir wissen, ob die neu identifizierten Mutationen auch einen funktionellen Effekt haben. Für diese Art der Untersuchung braucht man frisch entnommene, periphere Blutzellen von Patienten, welche die entsprechenden genetischen Veränderungen aufweisen. Entsprechendes Material haben wir für vier RYR1-Mutationen erhalten: p.D544Y, p.R2336H, p.E2404K und p.D2730G. Aus diesen Proben haben wir B-Lymphozyten gewonnen, die wir mit dem Epstein-Barr-Virus immortalisiert und in einem funktionellen Assay untersucht haben. Zu diesem Zweck haben wir den durch den Agonisten von RYR1 ausgelösten zyttoplasmatischen Ca²⁺-Anstieg mit einem Fluoreszenzmikroskop gemessen. Im Vergleich zu einem Normalkollektiv ist das zyttoplasmatische Kalzium der Lymphozyten von Mutationsträgern bei signifikant geringeren Konzentrationen von 4-chloro-m-Kresol und Koffein stimuliert worden. Diese Experimente zeigen, dass die Mutationen p.D544Y, p.R2336H, p.E2404K und p.D2730G tatsächlich einen funktionellen Effekt haben.

Tabelle 1. Mutationen im RYR1-Gen, die bei den untersuchten Patienten neu identifiziert wurden. Fett gedruckte Mutationen wurden auf ihren funktionellen Effekt hin untersucht.

Mutierte Base	Mutierte Aminosäure
c.38T>G	p.L13R
c.677T>A	p.M226K
c.1100G>T	p.R367L
c.1589G>A	p.R530H
c.1630G>T	p.D544Y
c.3127C>T	p.R1043C
c.4055C>G	p.A1352G
c.7007G>A	p.R2336H
c.7210G>A	p.E2404K
c.8026C>T	p.R2676W
c.8189A>G	p.D2730G
c.8360C>G	p.T2787S
c.8638G>A	p.E2880K
c.9649T>C	p.S3217P
c.9868G>A	p.E3290K
c.11314C>T	p.R3772W
c.11416G>A	p.G3806R
c.12864_12872dupCACGGCGGC	p.A4289_A4291dup
c.13502C>T	p.P4501L
c.14512C>G	p.L4838V
c.14627A>G	p.K4876R
c.14813T>C	p.I4938T

Praktische Schlussfolgerung

Die Resultate unserer Studie sind aus zwei Gründen für die Praxis relevant. Einerseits haben wir ein System erstellt, das erlaubt, das RYR1-Gen effizient zu analysieren. Das macht es künftig einfacher, bei Menschen mit einer Anfälligkeit auf maligne Hyperthermie nach neuen RYR1-Mutationen zu suchen. Die Ergebnisse haben aber auch einen unmittelbaren klinischen Nutzen. Jetzt kann nämlich die Liste der bisher 29-RYR1-Mutationen, die zur molekulargenetischen Untersuchung der malignen Hyperthermie gemäss EMHG-Richtlinien zugelassen sind, um vier Mutationen erweitert werden (www.emhg.org). Man kann also wesentlich mehr Patienten eine nichtinvasive, molekulare Diagnostik anbieten, und die Träger der neuen Mutationen können auf die offene Muskelbiopsie und den «In-vitro-Kontrakturtest» verzichten.

Ausblick

Effizientere Methoden zur Analyse des RYR1-Gens werden die Zahl der identifizierten RYR1-Mutationen noch weiter erhöhen. Dadurch wird das Bedürfnis immer dringender, eine internationale Datenbank einzurichten. Sie sollte alle RYR1-Mutationen umfassen, ihre populations-spezifische Prävalenz sowie den klinischen Verlauf einer bestimmten Episode von maligner Hyperthermie. Ein aus dem NFP53 entstandenes Umsetzungsprojekt verfolgt das Ziel, eine solche Datenbank auf der Basis der Europäischen Malignen Hyperthermie-Gruppe (EMHG) zu erstellen.

Die genaue Prävalenz der Anfälligkeit auf maligne Hyperthermie, die auf Mutationen im RYR1-Gen zurückgeht, bleibt weiterhin unklar. In Frankreich [3] und in Japan [4] wurden bei 7 bzw. 12% der Familien mit maligner Hyperthermie

Personen mit sogar mehr als einer Mutationen gefunden. Diese Resultate lassen vermuten, dass die Anfälligkeit auf maligne Hyperthermie deutlich häufiger ist, als bisher geschätzt wurde. Die Entwicklung einer effizienten Typisierung des RYR1-Gens könnte die Frage der Prävalenz in entsprechenden Bevölkerungsstichproben klären.

Die wichtigste Botschaft

Neu umfasst die Liste zur molekulargenetischen Diagnose der vererbten malignen Hyperthermie (MH) vier weitere Mutationen des RYR1-Gens. Bisher waren es 29. Das erlaubt, häufiger als früher bei Patienten, die aus einer Familie mit MH-Mutation stammen, einen Gentest durchzuführen, statt eine invasive Muskelbiopsie vorzunehmen.

Literatur

- 1 Urwyler A, Deufel T, McCarthy T, West S. Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 2001;86(2):283–7.
- 2 Girard T, Urwyler A, Censier K, Mueller C, Zorzato F, Treves S. Genotype-Phenotype Comparison of the Swiss Malignant Hyperthermia population. *Hum Mutat* 2001;18:357–8.
- 3 Monnier N, Krivosic-Horber R, Payen JF, et al. Presence of two different genetic traits in malignant hyperthermia families:

implication for genetic analysis, diagnosis, and incidence of malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology* 2002; 97(5):1067–74.

- 4 Ibarra MC, Wu S, Murayama K, et al. Malignant hyperthermia in Japan: mutation screening of the entire ryanodine receptor type 1 gene coding region by direct sequencing. *Anesthesiology* 2006;104(6):1146–54.

Korrespondenz:
PD Dr. med. Thierry Girard
Departement Anästhesie
Universitätsspital
CH-4031 Basel
thierry.girard@unibas.ch

Korrigendum

In Heft 41/2008 hat sich beim Besonderen Fall, «*Bacteroides-fragilis*-assoziierte Aortitis abdominalis», ein kleiner Fehler eingeschlichen. Die Korrespondenz-Mailadresse der Autorin Nora Schaub lautet korrekt: noschaub@uhbs.ch. Die Online-Ausgabe wurde korrigiert.